

О ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТЕРИОЗА
(*LISTERIA MONOCYTOGENES*) И КРОВОСОСУЩИХ БЛОХ

А. Н. Алексеев, Р. В. Гребенюк, П. А. Чиров и А. М. Кадышева

Всесоюзный научно-исследовательский институт дезинфекции
и стерилизации Минздрава СССР, Москва и Институт биологии
АН Киргизской ССР, Фрунзе

Методом индивидуального дозированного кормления разными количествами листерий были заражены блохи *Leptopsylla segnis*, *Ceratophyllus consimilis* и *C. laeviceps*. Они сохраняют возбудителей до 15 суток (срок наблюдения), выделяют их с фекалиями и могут передавать через укус белым мышам. Для *L. segnis* показано наличие оптимальных заражающих доз листерий, что свидетельствует о специфичности их взаимоотношений и о возможной роли этого вида в переносе листерий в природе. То же относится и к *C. consimilis*.

Листерия — антропозоонозное заболевание (Сахаров, Гудкова, 1954; Триполитова, Борисова, 1965; Бакулов, 1967). Возбудителя листериозной инфекции часто выделяют не только из грызунов, но и из их эктопаразитов, в том числе блох (Михайлова, Якунина, 1962; Юркина, 1963). По данным Рассказовой и Прокопьева (1962) и Огневой (1964), блохи могут передавать возбудителя этого заболевания через укус. Учитывая, что эктопаразиты грызунов (клещи) могут хранить и передавать инфекцию, вызывающую течение эпизоотий среди грызунов, Олсуфьев (1955) высказался в пользу природноочагового характера этой инфекции.

Настоящее исследование, проведенное в Лаборатории паразитологии Института биологии АН КиргССР, имело целью выяснить возможную роль различных видов блох в циркуляции возбудителя листериоза в природе. Анализу были подвергнуты заражаемость блох, сохранение и размножение *L. monocytogenes* в них, выделение листерий во внешнюю среду. В качестве основного критерия специфичности взаимоотношений был избран предложенный ранее (Алексеев, 1968) критерий наличия оптимальной заражающей дозы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В опытах использовали блох полевков — *Ceratophyllus consimilis* Wagn., песчанок — *C. laeviceps* Wagn. и мышей — *Leptopsylla segnis* Schönch.¹ Опыты проводили в июле 1969 г. Температура помещения, в котором содержали и заражали блох, колебалась от 24 до 28°. Перед заражением блох выдерживали голодными в течение 2—4 суток. Каждую особь заражали индивидуально через капилляр строго определенной дозой взвеси листерий по разработанной нами методике (Алексеев, 1965; Алексеев, Бибилова, Хрущевская, 1967). Суспензию готовили из смыва 1—2-суточной культуры листерий на косом агаре (культура выделена А. М. Кадышевой из мозга лесной мыши, 1967 г.). Количество микробов

¹ Авторы выражают свою благодарность В. А. Бибиловой, любезно предоставившей культуру указанных видов блох.

вычисляли по бактериальному стандарту и затем доводили до нужной концентрации путем последовательных разведений физиологическим раствором. Последнее разведение смешивали с равным количеством гемолизированной крови морской свинки. Число микробных тел во взвеси проверяли методом последовательных разведений и посева на агар до начала кормления блох и повторно по окончании работы. Насекомые получали в разных опытах от десятков до сотен тысяч микробных тел. Зараженных блох содержали в тех же условиях, что и незараженных (при 85—90% относительной влажности).

Зараженных блох один раз в 2 дня подкармливали (индивидуально под пробиркой) на брюшке здоровых белых мышей.

Через различные промежутки времени (0,3, 24, 48 час. и 5—15 суток) блох замаривали хлороформом, промывали один раз в 96° спирте и 2 раза в дистиллированной воде и растирали в ступке в 1.0 мл физраствора. Затем по 0.1 мл сеяли в возрастающих разведениях на кровяной агар (разведением 1 : 10 считалась суспензия, приготовленная из растертой блохи в 1.0 мл физраствора). В опытах, имевших целью определить содержание листерий в фекалиях блох, кровососов кормили взвесью листерий (10^9 микробных тел в 1 мл) через биомембрану, затем отсаживали в колбу на стерильный песок.

Блох периодически подкармливали на здоровых мышах, а фекалии собирали на стерильный песок. Песок и блох (по 10 экз.) исследовали на наличие и длительность сохранения листерий. Пробы песка из разных колб брали с недельными интервалами. У блох, зараженных на мембране и содержащихся в последующем на здоровых мышах, были также исследованы яйцекладки и выплывшие личинки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методом индивидуального кормления было заражено разными дозами микробов 440 особей трех видов блох. Данные о заражаемости и сохранении *L. monocytogenes* в блохах представлены в таблице. Из таблицы следует, что видовые отличия в заражаемости и сохранении микробов у изученных видов практически отсутствуют. Минимальные дозы, использованные для успешного заражения блох, — десятки, сотни микробных тел.

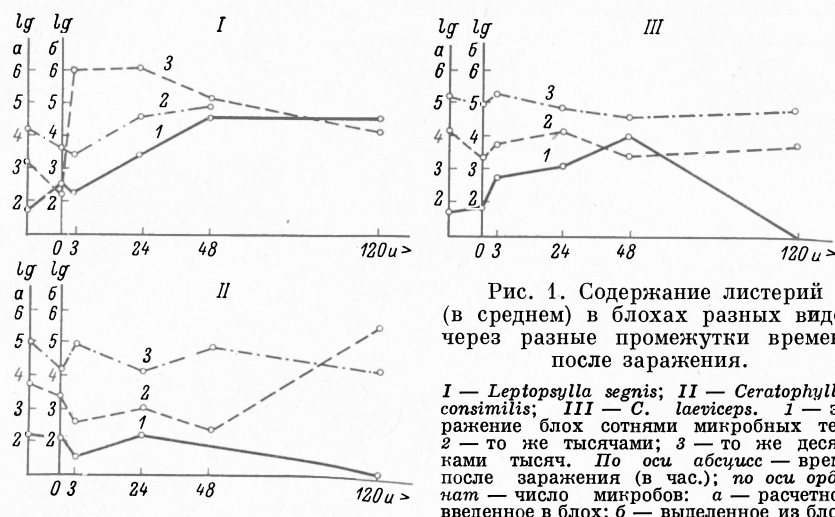
Заражаемость блох разных видов листериями и сохранение возбудителя в их организме

Вид блох	Количество зараженных блох через разные интервалы					
	от 0 до 3 час.		от 24 до 48 час.		от 5 до 15 суток	
	число блох в опытах	число зараженных особей (в %)	число блох в опытах	число зараженных особей (в %)	число блох в опытах	число зараженных особей (в %)
<i>Leptopsylla segnis</i>	54	87 ± 4.5	45	82.2 ± 5.7	12	41.6 ± 14.2
<i>Ceratophyllus consimilis</i> . .	40	95.0 ± 3.3	31	90.5 ± 5.3	15	46.5 ± 12.8
<i>Ceratophyllus laeviceps</i> . . .	117	89.7 ± 2.8	81	78.0 ± 4.6	45	34.6 ± 7.1

У *Ceratophyllus laeviceps* к 5—15-му дню после заражения наблюдается очевидное и статистически достоверное снижение числа остающихся инфицированными особей ($td=5.1$, $v \geq 0.999$). То же и у *C. consimilis* ($td=3.2$). Видимо, наиболее стойко и длительно сохраняются листерии в организме *L. segnis*: достоверность уменьшения числа зараженных блох со 2-го на 15-й день несколько ниже, чем у *Ceratophyllus* ($td=2.7$). Анализ данных, приведенных на рис. 1, не противоречит этому: на протяжении 2—5 суток титр листерий в *L. segnis* сохраняется на равномерно высоком уровне. Даже при минимальных заражающих дозах (десятки микробных тел) количество листерий в этом виде достигает наиболее высоких цифр через

48 час. и в отличие от *Ceratophyllus* сохраняется на этом уровне на всем протяжении наблюдений (рис. 1, I, I). При средних заражающих дозах (тысячи микробных тел) в *L. segnis* через 3—24 часа обнаруживали миллионы жизнеспособных микробных клеток. Средний уровень содержания листерий при сходных условиях заражения также оказался несколько выше у *L. segnis* по сравнению с *C. consimilis* и *C. laeviceps*. Однако резких видовых отличий в сохранении и размножении листерий в организме изученных видов по этим показателям отметить не удалось.

У всех трех видов зарегистрировано выделение с фекалиями жизнеспособных листерий. У *C. laeviceps*, зараженных кормлением через биомем-



брану миллиардной культурой листерий и в последующем подкармливаемых на здоровых мышах, листерии выделялись с фекалиями на протяжении недели (срок наблюдений).

Через 8 дней после инфицирующего кормления зараженными оставались 20% блох, через 17 дней — 10%. На 5-й день после заражения титрование смыва из 1 см³ песка, на который было посажено 200 блох, дало десятки тысяч жизнеспособных листерий. Возбудитель в фекалиях сохранял жизнеспособность в сухом песке в течение 14—17 суток после выделения их блохами, зараженными за 1, 3, 5 суток до этого. Число живых клеток исчислялось тысячами в смывах из 1 см³ песка. Через 20—24 дня листерий в фекалиях обнаружить не удалось.

Как и следовало ожидать, трансвариальной передачи листерий обнаружено не было. Исследование яиц заведомо зараженных блох² (7 проб по 50 яиц) и выплывших из них личинок (3 пробы с общим количеством 200 личинок) дало отрицательные результаты. Лишь в первой пробе из 50 яиц, отложенных сразу после заражения, при посеве на МПБ обнаружены единичные листерии, что, очевидно, связано с попаданием на их поверхность листерий из фекалий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Следовательно, налицо все признаки, характеризующие блох как возможных переносчиков листериоза: они легко заражаются листериями, микробы сохраняются и размножаются в их организме и выделяются с фекалиями во внешнюю среду, передаются через укус (наши данные и данные Огневой, 1964), блохи встречаются спонтанно зараженными в природных условиях (Михайлова, Якунина, 1962; Юркина, 1963).

² Всего в этих опытах было заражено 600 блох, протитрованы индивидуально 3 пробы по 10 блох. Зараженность 50—60%. Из блох выделялись сотни тысяч жизнеспособных листерий.

Естественно, возникает вопрос о специфичности взаимоотношений листерий и блох разных видов, о степени взаимной адаптированности этого возбудителя и представителей *Siphonaptera*.

Мы не имеем пока данных о выживаемости и плодовитости зараженных особей, поэтому не можем судить, являются ли листерии комменсалами или паразитами в организме блох. Однако мы располагаем данными об уровне размножения листерий в кишечнике блох в зависимости от исходной заражающей дозы. Воспользовавшись гипотезой, выдвинутой А. Н. Алексеевым (1968), о наличии заражающих доз особо благоприятных для заражения переносчика, отношения которого с данным видом возбудителя носят специфический характер, мы попытались проанализировать полученные данные об уровне заражения *L. seignis*, *C. consimilis* *C. laeviceps* разными количествами листерий. Результаты представлены на рис. 2.

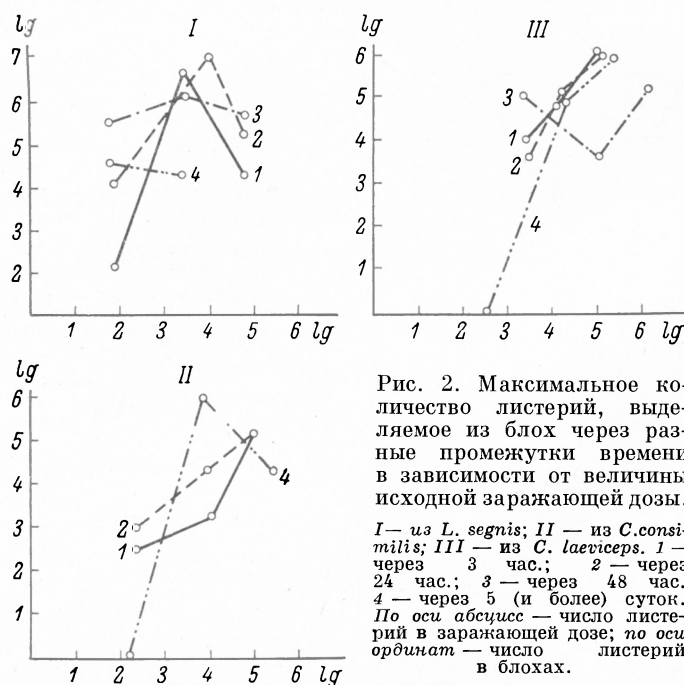


Рис. 2. Максимальное количество листерий, выделяемое из блох через разные промежутки времени в зависимости от величины исходной заражающей дозы.

I — из *L. seignis*; II — из *C. consimilis*; III — из *C. laeviceps*. 1 — через 3 час.; 2 — через 24 час.; 3 — через 48 час. 4 — через 5 (и более) суток. По оси абсцисс — число листерий в заражающей дозе; по оси ординат — число листерий в блохах.

Точки, по которым проведены кривые, отражают максимальные количества жизнеспособных возбудителей, обнаруживаемые в блохах, зараженных исходно разными дозами возбудителей.

Как видно из рис. 2, кривые, обозначающие число листерий в *L. seignis* через 3, 24 и 48 час. после заражения, имеют отчетливые максимумы. Количество листерий в *L. seignis* при массивном, превышающем оптимум, заражении уменьшается (см. также рис. 1) и насчитывает десятки тысяч независимо от исходной заражающей дозы листерий для *L. seignis*, средней из числа использованных и лежащей в пределах 10^3 — 10^4 микробных тел на 1 особь.

Почти противоположная картина у *C. laeviceps*. У них не наблюдается не только максимума, но даже происходит падение числа микробных клеток у исследованных через 48 час. блох, зараженных исходной дозой, равной 10^4 микробных тел (рис. 2, III, 3). *C. consimilis* занимают промежуточное положение: максимум мы наблюдали лишь в одном случае из трех и то лишь после длительного пребывания листерий в организме этого вида.

Исследование 7 субкультур листерий, выделенных после 10-дневного пребывания в организме блох, показало, что биохимические свойства использованного штамма почти не изменились. На 2-е сутки листерии разлагали глюкозу, мальтозу, галактозу, рамнозу, декстрозу, глицерин и левулезу

с образованием кислоты без газа, что соответствует исходным свойствам штамма; на 6-е сутки отмечено слабое образование кислоты в ксилозе.

В опыте по изучению вирулентности штамма, прошедшего через организм разных видов блох, было заражено 80 белых мышей по 4 животных каждой дозой. DL_{50} двух субкультур, выделенных из *C. consimilis* (№ 187, 338), одной из *C. laeviceps* (№ 172) и одной из *L. segnis* (№ 449), была равной 1000 микробным клеткам. Лишь одна субкультура (№ 394), выделенная на 10-й день после заражения *L. segnis*, несколько снизила свою вирулентность. 50% гибели мышей получено лишь при введении им 100 тыс. и 1 млн микробных клеток.

Если принять справедливость выдвинутого нами критерия наличия оптимальных заражающих доз, то можно считать, что взаимоотношения между возбудителем листериоза и блохами мышей *L. segnis* носят специфический характер взаимно-адаптированной пары. Следовательно, *L. segnis* может быть переносчиком этой инфекции в популяции мышей в природных условиях. Напомним, что использованный нами штамм № 77 *L. monocytogenes* был выделен именно из лесной мыши.

Участие полевок в эпизоотиях листериоза также известно (Огнева, 1964) и потому не удивительна возможная, хотя и меньшая, адаптированность возбудителя листериоза к блохам полевок *C. consimilis*, которые, кроме того, могут паразитировать и на лесных мышах (Иофф и Бондарь, 1956). Напротив, случаев выделения *L. monocytogenes* из песчанок или из их блох нам неизвестны. Интересно отметить, что подобно тому, как это происходит с *Pasteurella pestis* в блохах (Алексеев, Бибикова и Хрусцелевская, 1969), в организме *L. segnis* и *C. consimilis* в двух случаях из 3 исследованных заражающих доз в течение первых 3 час. наблюдалось снижение числа возбудителя в кишечнике блох (рис. 1, I, II). У зараженных *C. laeviceps*, подобно тому как это происходит в пробирке, наблюдался рост числа листерий в первые же часы после заражения (рис. 1, III). Эти факты также свидетельствуют, по нашему мнению, о специфичности взаимоотношений *L. monocytogenes* и блох мышевидных грызунов.

Полученные нами данные говорят о возможной роли блох мышевидных грызунов в циркуляции возбудителя листериоза в природе и в поддержании природных очагов этой инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Блохи мышевидных грызунов — *Leptopsylla segnis*, *Ceratophyllus consimilis* и песчанок — *C. laeviceps* легко заражаются в эксперименте возбудителем листериоза *Listeria monocytogenes*, длительно сохраняют его, выделяют с фекалиями во внешнюю среду и передают здоровым мышам через укус.

2. Видовых отличий в заражаемости и длительности сохранения листерий у 3 изученных видов блох обычными методами отметить не удалось.

3. Наличие оптимальных заражающих доз, особо благоприятных для размножения листерий в организме *L. segnis* и в меньшей степени в *C. consimilis*, говорит о специфичности взаимоотношений блох указанных двух видов с возбудителем листериоза. Роль *L. segnis* и *C. consimilis* как переносчиков *L. monocytogenes* среди грызунов вполне возможна. Напротив, отсутствие оптимума для заражения блох песчанок *C. laeviceps* говорит о меньшей вероятности участия этого вида блох в переносе *L. monocytogenes*.

Л и т е р а т у р а

- А л е к с е е в А. Н. 1965. Принудительное дозированное кормление насекомых. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 4: 467—471.
А л е к с е е в А. Н. 1968. Susceptibility of vectors to the mean doses of pathogenic agents as a criterium of their mutual adaptations. Abstr. of Papers XIII Intern. Congr. of Entomology, M.: 7.

- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1967. Методика индивидуального принудительного дозированного заражения блох микробами чумы. Паразитол., 1 (2): 176—179.
- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1969. Некоторые доказательства существования бактерицидного фактора в организме кровососов на примере блох — переносчиков чумы. Паразитол., 3(3): 228—235.
- Бакулов И. А. 1967. Листериоз сельскохозяйственных животных. М.: 3—295.
- Иоффе И. Г. и Бондарь Е. П. 1956. Блохи Туркмении, Тр. н.-иссл. противочумн. инст. Кавказа и Закавказья, Ставрополь, 1: 60—61.
- Кадышева А. М. и Половинкина Л. В. 1967. Листериоз грызунов. Сельское хозяйство Киргизии, 12: 1—38.
- Михайлова О. А. и Якунина Т. И. 1962. Обнаружение возбудителя листериоза у грызунов г. Владивостока. Докл. Иркутск. противочумн. инст., 4: 210—222.
- Огнева Н. С. 1964. Об эпизоотологии листериоза грызунов. Зоол. журн., 43 (9): 1373—1381.
- Олсуфьев Н. Г. 1955. О возможной роли кровососущих членистоногих в передаче листериоза и эризипелоида. Восьмое совещ. по паразитол. пробл., Тез. докл.: 109.
- Расказова А. К. и Прокопьев В. Н. 1962. Изучение возможности хранения и передачи блохами листериозной инфекции. Докл. Иркутск. противочумн. инст., 4: 212—217.
- Сахаров П. П. и Гудкова Е. И. 1954. Листереллезная инфекция. Медгиз, М.: 1—182.
- Триполитова А. А. и Борисова Г. В. 1965. Листериоз. Томск: 1—257.
- Юркина В. И. 1963. Блохи емуранчика (*Scriptoroda telum*) на выпадок їх спонтанної зараженності збудником листериозу. Доповіді Академії наук Української ССР, 7: 970—972.

ON THE RELATIONSHIPS BETWEEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND BLOODSUCKING FLEAS

D. N. Alekseev, R. V. Grebenjuk, P. A. Chirov and A. M. Kadysheva

SUMMARY

Fleas *Leptopsylla segnis*, *Ceratophyllus consimilis* and *C. laeviceps* were infected with various numbers of *Listeria* by the method of individual dose feeding through capillary. All three species infected with *Listeria*, preserve them up to 15 days, excrete them with faeces and transmit them to white mice through biting.

The author gives optimal (10^3 — 10^4 microbial bodies per individual on the average) infecting doses with *Listeria* for *L. segnis* that suggests the specificity of relationships between this species and *Listeria* and a possible role of this species in the transmission of *Listeria* from rodent to rodent in nature. According to this character, fleas of voles, *C. consimilis*, can also take part in the circulation of the agent. Interrelations between *Listeria* and *C. laeviceps*, fleas of gerbils, are not, apparently, of specific nature.